Das Hämpräkursoren-Muster des menschlichen Neugeborenenblutes

Dieter Schmidt

1967

Aus der II. Frauenklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. R. Fikentscher)
und dem Institut
für Hämatologie der GSF, Assoziation Euratom, München
(Leiter: Professor Dr. W. Stich)

DAS HÄMPRÄKURSOREN-MUSTER DES MENSCHLICHEN NEUGEBORENEN-BLUTES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dieter Schmidt
aus München/Obb.

München
1967

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. R. Fikentscher
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. Stich
Dekan:	Professor Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 1967

REUTHER-DRUCK
München 13, Ainmillerstraße 4

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meiner lieben

M U T T E R

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0069

I Einleitung und Fragestellung

II Untersuchungsgut und Methodik

1. Untersuchungsgut

2. Methodik

a) Bestimmung der Porphyrine

α Erythrocyten

β Serum

γ Chromatographischer Nachweis

b) Bestimmung der Porphyrinvorstufen

α Erythrocyten

β Serum

III Ergebnisse

1. Porphyrine

a) Erythrocyten

b) Serum

2. Porphyrinvorstufen

a) Erythrocyten

b) Serum

3. Vergleich

IV Besprechung

V Zusammenfassung

VI Schrifttum

I EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Der Nachweis von Porphyrinen in fetalen Blutbildungsstätten und ausgeschwemmten Erythroblasten gelang relativ früh BORST und KÖNIGSDÖRFFER aufgrund der Fluoreszenzeigenschaft dieser Hämvorstufen.

Die Gegenwart von freiem Protoporphyrin in zirkulierenden Erythrocyten wurde erstmals von HIJMANS VAN DEN BERGH beschrieben.

FIKENTSCHER fand durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen aetherlösliches Porphyrin in Erythrocyten von Feten und Neugeborenen, im Serum von Feten und Neugeborenen aetherlösliches Porphyrin, das spektrographisch die Eigenschaften von Koproporphyrin aufwies.

WATSON konnte erstmals 1950 Koproporphyrin in Erythrocyten nachweisen.
Ein Verfahren zur Auftrennung von Kopro- und Protoporphyrin aus den Erythrocyten Erwachsener wurde von SCHWARZ und WIKOFF angegeben.
HSIA und PAGE bestimmten 1954 fluorimetrisch den Kopro- und Protoporphyringehalt von Erythrocyten Neugeborener und junger Kinder.

Es wurde nun mit Hilfe moderner, z.T. neu entwickelter Methoden versucht, die Frage zu klären, ob beim Neugeborenen an der Schwelle zum extrauterinen Leben qualitative oder quantitative Abweichungen vom HÄMPRÄKURSOREN-MUSTER DES ERWACHSENEN bestehen, wobei erstmals die Porphyrinvorstufen, das Porphobilinogen und die δ-Aminolävulinsäure miterfaßt wurden.

II UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODIK

1. UNTERSUCHUNGSGUT

Zur Verwendung gelangte unmittelbar postpartal durch Nabelschnurvenenpunktion mit weitlumiger Kanüle entnommenes Blut, das durch Oxalat- oder Heparinzusatz ungerinnbar gemacht worden war.

Die Trennung von Serum und Erythrocyten erfolgte durch mehrfaches Zentrifugieren und Abpipettieren des überstehenden Serums. Die Erythrocyten wurden anschließend mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zur Volumenbestimmung in graduierten Röhrchen abzentrifugiert. Zur Entfernung geringster Mengen korpuskulärer Bestandteile (Leukocyten) wurde das abpipettierte Serum 15 Min. bei 4500 U/MIN zentrifugiert und nur die obere Hälfte abgesaugt und weiterverwendet, um einwandfreies, sicher zellfreies Serum zu gewinnen. Der spärliche weiße Bodensatz bestand fast ausschließlich aus Leukozyten. Das Serum, durchscheinend klar und von hell- bis dunkelgelber Farbe zeigte keine Anzeichen von Hämolyse.

Unter den 50 Proben, die alle aus dem Jahr 1966 stammten, befanden sich 46 Fälle mit regelrechtem Geburtstermin im Bereich der anerkannten Schwankungsbreite, darunter 2 Fälle mit deutlichen klinischen Übertragungszeichen, 2 Fälle mit vorzeitigem Geburtstermin und Zeichen der Unreife (Anfang Mens X), 1 Fall rein rechnerischer Übertragung ohne klinische Zeichen, 1 Fall erheblicher rechnerischer Übertragung mit ausgeprägter klinischer Symptomatik, massiver Infarzierung der Placenta und Zeichen von Placenta-Insuffizienz.

2. METHODIK

a) Porphyrine

α) Erythrocytenverfahren

In Vorversuchen zur Bestimmung des Erythrocyten-Porphyrins wurden die Verfahren von WATSON und GRINSTEIN mit einem von S. SCHWARZ, M.H. BERGH, J. BOSSENMAIER und H. DINSMORE modifizierten GRINSTEIN-VERFAHREN verglichen. Letztere Methode hat sich in etwas veränderter Form mit der Zielsetzung spektralphotometrischer Messung bei eigenen Untersuchungen bewährt.

Bei den 3 vorgenannten Verfahren erfolgte die Bestimmung von Kopro- und Protoporphyrin fluorimetrisch durch Vergleich mit Porphyrin-Standard; das hier angewandte Verfahren ermöglicht infolge der spektralphotometrischen Messung des Extinktions-Maximums neben der quantitativen Festlegung die Porphyrin-identifizierung durch Beachtung des Extinktions-Gipfels.

Sämtliche Chemikalien wiesen Analysenreinheit auf.

Ausgangsmenge: 5 (4-6) ml mehrfach gewaschene Erythrocyten

VERFAHREN

Nach kurzzeitiger Homogenisierung der Erythrocyten mit Pistill in Reibschale unter Zugabe einer kleinen Menge eines AETHYLACETAT-EISESSIG-Gemisches 4:1 erfolgte die Porphyrin-extraktion mit dem gleichen Gemisch unter Sog mithilfe eines

Glas-Porenfilters Schott G 3 durch weiteres Zerreiben des Erythrocytenbreies mit dem flachen Ende eines Pistills, bis das Filtrat nahezu farblos wird (1); es sind etwa 200 ml eines Aethylacetat-Eisessig-Gemisches 4:1 erforderlich; anschließend Waschung mit 1/2 Vol. 3 % Na-Acetat-Lösung, enthaltend 0, 005 % J_2 (Oxydation von Porphyrinogenen zu Porphyrin) und 2 mal mit je 1/4 Vol. 3 % Na-Acetat-Lös. ohne J-Zusatz. (2) Unter intensivem Ausschütteln erfolgt Übernahme in 3-n HCl in Portionen von 4-6 ml bis zur negativen Fluoreszenz bzw. Fehlen einer spektralphotometrischen Extinktion der HCl-Portionen (3). Abpufferung der Lösung mit festem Na-ACETAT bis zum Farbumschlag von Congo-Indikator-Papier, Übernahme in Aethylacetat durch 3-maliges Ausschütteln mit je 1/2 bis 2/3 Vol. Aethylacetat (4), Waschung mit aqua dest. bis ca. Ph 5 im Waschwasser und quantitative ABTRENNUNG von KOPROPORPHYRIN durch Ausschütteln mit 4-ml-Portionen n/5 HCl (4-5 x) aus der durch kurzzeitige Ventilation im Abzug auf 40 ml geringfügig eingeengten Aethylacetatfraktion (5); durch Ausschütteln mit 2 x je 4 ml Chloroform wird die n/5 HCl von mitübernommenem Protoporphyrin befreit (6). Koproporphyrin bleibt in der Salzsäure zurück. Das zur Rückextraktion von Protoporphyrin verwendete Chloroform wird dem Aethylacetat aus(5) zugesetzt, das Volumen durch kurzzeitige Ventilation im Abzug auf ca. 1/3 eingeengt und im 25-ml-Scheidetrichter 2 x mit je 6 ml 5 % HCl, dann 2 x mit je 3 ml 5 % HCl ausgeschüttelt.

Quantitative Festlegung des Protoporphyrins erfolgt entsprechend Eichkurve mit Reinsubstanz nach spektralphotometrischer Bestimmung der maximalen Extinktion (Gipfel bei 407 - 408 mμ Soretbande) jeder HCl-Portion unter Berücksichtigung des Volumens und Subtraktion der Summe aus 32/70 der Differenz der unspezifischen Extinktionen bei 370 und 440 mμ und der unspezifischen Extinktion bei 440 mμ. Durch fraktioniertes Ausschütteln und Messung der Einzelvolumina besteht die Möglichkeit, die Vollständigkeit der Extraktion zu überwachen.

Infolge des mehrfachen Phasenwechsels sind die Meßlösungen relativ rein und weisen entsprechend niedrige unspezifische Extinktionen auf.

Weiterverarbeitung und Bestimmung des Erythrocyten-Koproporphyrins erfolgt durch Abstumpfen des n/5 HCl-Extraktes gegen Congo, Übernahme in 3 x 1/2 Vol. Aethylacetat, Waschung mit aqua dest. bis ca Ph 5 des Waschwassers, Einengung des Volumens durch kurzzeitige Ventilation auf 5-6 ml, 2-malige Extraktion mit je 1 ml 5 % HCl unter Verwendung einer Spezial-Trennvorrichtung, spektralphotometrische Messung der salzsaueren Extrakte (2x je 1 ml 5 % HCl, Absorbtionsmaximum in 5 % HCl bei 402 mμ) in Halbmikroküvetten unter Subtraktion der Summe aus 28/50 der Differenz der Extinktionen bei 380 und 430 mμ und der Extinktion bei 430 mμ (Ebenfalls hoher Reinheitsgrad der Meßlösungen). Berechnung erfolgt durch Vergleich mit Koproporphyrin-Eichkurve.

Zur Erfassung von aethylacetat-unlöslichem bzw. -schwerlöslichem Porphyrin wurde ein von CLOTTEN angegebenes Verfahren eingesetzt, unter Verwendung der trockenen Rückstände von (1), der Waschlösung aus (2) und der wässrigen Rückstände nach (3) bei der Übernahme in Aethylacetat.

β) Serumverfahren

Ein zur Serum-Porphyrinbestimmung beim Gesunden geeignetes Verfahren ist nicht bekannt, da ein sicherer konstanter Porphyrinnachweis im Serum Gesunder bisher nicht gelang. Das von FISCHER angegebene, von HIJMANS VAN DEN BERGH modifizierte Verfahren zur Porphyrinbestimmung im Serum Porphyrie-Kranker, das sich der Eisessig-Aether-Extraktion mit nachfolgender Methanolveresterung der Plasmarückstände und Verseifung der Ester bedient, wurde wegen der hohen Koproporphyrinverluste vor allem bei der Aetherwaschung verlassen (30-50 % Verlust). Durch gepuffertes Waschen des Aethers mit 2 % Na-Acetat-Lösung konnten die hohen Porphyrinverluste vermieden werden und die Ergebnisse entsprachen dem nachstehend beschriebenen Verfahren, doch waren die Meßlösungen durch Veresterungsprodukte so verunreinigt, daß eine präzise quantitative Festlegung nicht möglich war.

So wurde folgendes Verfahren entwickelt mit der Möglichkeit spezieller Isolierung von Koproporphyrin:

Emulgierung von 8 - 16 ml Serum mit dem 1 1/2-fachen Vol. Aethylacetat durch intensives Rühren (ca. 3 Min.) in Glasporen-Filter Schott G 4 g (1).

Extraktion unter Sog in dem oben angegebenen Glasporen-Filter durch Zugabe des ca. 12-fachen Volumens eines Aethylacetat-Eisessig-Gemisches 4:1 verteilt auf 25-ml-Portionen unter fortwährendem Zerreiben ausgefällter Eiweißmengen mit dem flachen Ende eines Pistills ähnlich dem Erythrocyten-Verfahren. Zurück bleibt ein weißlicher feinpulveriger Rückstand von gefälltem Eiweiß (2). Filtration des Aethylacetats durch mittelfeines Papierfilter zur Abtrennung feinster bei der nachfolgenden Waschung emulsionsbildender Trübungen (3); Waschung mit 3 x 1/5 Vol. 3 % Na-Acetat-Lös. (4); Ausschütteln mit 1/4 Vol. 4n-HCl verteilt auf 4 Einzelportionen (5), Rückführen in Aethylacetat nach Abstumpfung mit festem Na-Acetat gegen Congo (6), Waschung mit aqua dest. bis Ph 5 des Waschwassers; anschließend Abtrennung von Koproporphyrin mit n/5 HCl (HCl : Aethylacetat ca. 1: 2, 5) verteilt auf 4-5 Einzelportionen (7), Rückführung von Koproporphyrin in Aethylacetat nach Abstumpfung mit Na-Acetat gegen Congo, Einengung nach 2-maliger Waschung mit aqua dest. durch Ventilation auf 3 ml; zweimaliges Ausschütteln mit je 0, 5 ml 5 % HCl und spektralphotometrische Messung in Halbmikroküvetten entsprechend dem Erythrocyten-Verfahren.

Es folgt die Extraktion von Porphyrin mit hoher Salzsäure-Zahl

aus dem koproporphyrinfreien Aethylacetat nach Vorgang (7) mit ca. 1/4 Vol. 4n-HCl, verteilt auf 4 Portionen; Abstumpfung mit festem Na-Acetat gegen Congo, Rückführung in Aethylacetat und Waschung entsprechend dem Erythrocytenverfahren; Einengung durch Ventilation auf 1 ml; Übernahme in 0,5 ml 7,5 % HCl durch intensives Ausschütteln; spektralphotometrische Messung des Extinktionsmaximums. Berechnung erfolgte entsprechend den oben angegebenen Verfahren unter Subtraktion der unspezifischen Extinktion.

γ) Chromatographischer Nachweis

Die papierchromatographische Identifizierung von Proto- und Koproporphyrin aus Erythrocyten und Koproporphyrin aus Serum erfolgte nach der Methode von KEHL und STICH. Die vor allem im Serum erheblichen Verunreinigungen im Hinblick auf Reinheitsansprüche für die Chromatographie, wurden durch mehrfachen vorangehenden Phasenwechsel soweit reduziert, daß störende Einflüsse entfielen. Durch Auftragen auf engstem Raum mittels feiner Kapillarpipetten und Verkürzung der Laufstrecken konnten noch ca. 1/3 der sonst erforderlichen Minimalmenge einwandfrei nachgewiesen werden (es genügten für Kopro: 0,3 - 0,5 γ , für Proto: 0,8 γ). Die aus den Einzelproben gewonnenen Koproporphyrinmengen waren im Gegensatz zu Protoporphyrin nicht ausreichend zur chromatographischen Identifizierung. Chromatographisch dargestelltes Kopro-

porphyrin stammte daher aus Sammelproben, Protoporphyrin aus Einzelproben.

Die Identifizierung von Serum- und Erythrocyten-Koproporphyrin aus Einzelproben und Serum-Protoporphyrin aus Sammelproben sowie die Auftrennung der Koproporphyrin-Isomeren I u. III erfolgte nach der Doppelentwicklungstechnik der Porphyrin-Methylester nach CHU im Anschluß an mehrfache Reinigung der Ausgangslösung. Zur deutlichen Darstellung sind ausreichend bei Protoporphyrin ca. 0,2 - 0,3 γ, bei Koproporphyrin III 0,005 - 0,01 γ, Koproporphyrin I ca. 0,05 γ.

Insgesamt wurden 4 Chromatogramme nach Kehl-Stich (Erythrocyten-Protoporphyrin aus Einzel-, Erythrocyten- u. Serum-Koproporphyrin aus Sammelproben) und 7 Chromatogramme nach CHU angefertigt (Erythrocyten- u. Serum-Koproporphyrin u. Erythrocyten-Protoporphyrin aus Einzelproben, sowie Serum-Protoporphyrin aus Sammelproben).

b) Porphyrinvorstufen

α) Erythrocyten

Von CLOTTEN wurde eine Methode angegeben zur Bestimmung von Porphobilinogen und δ-Aminolaevulinsäure (DAL) aus Erwachsenen-Erythrocyten (Erythrocytenhämolyse mit 2 Vol. aqua dest., Eiweißfällung mit Trichloressigsäure, Abzentrifugieren,

Lyophilisieren der Lösung und Aufnahme in 1 ml 0,2 m Essigsäure bzw. in 1 ml Acetatpuffer v. Ph 4,6, spektralphotometrische Messung nach Zugabe von 1 ml Ehrlich-Reagens bzw. modifiziertem Ehrlich-Reagens im Anschluß an Koppelung mit Acetylaceton nach KNORR).

Erschwerend bei der quantitativen Erfassung ist die starke Verunreinigung der Meßlösung, da weitere Reinigungsvorgänge fehlen, die trotz Zusatzes von Jodacetamid nicht völlig ausschaltbare Störung der Farbreaktion durch Beimengungen sowie der Umstand, daß zum Teil erhebliche "Leerextinktionen" nicht berücksichtigt werden können. Davon abweichend wurde folgendes Verfahren zur Bestimmung von Porphobilinogen und δ -Aminolaevulinsäure (DAL) in Erythrocyten entwickelt:

VERFAHREN

Hämolyse von 2,5 (± 0,5) ml gewaschener Erythrocyten mit dem 4-fachen Volumen aqua dest. bei ca. 4^{o} C (1). Fällung mit Aceton (2,5-faches Volumen der wässerigen hämolytischen Lösung) (2); anschließend 3 Min. Quirlen im Homogenisator bei mittlerer Drehzahl zur Förderung feiner Eiweißfällung und Vermeidung gröberer Klumpenbildung (3). Abzentrifugieren des feinlockig gefällten Eiweißes (15 Min. bei 4500 U/Min.), Dekantieren in 250-ml-Becherglas und Filtrieren der dekantierten Lösung durch mittelfeines Papierfilter (4). Entfernung des Acetons erfolgt unter Sog durch Vakuumpumpe oder

Ventilation des Flüssigkeitsgemisches in größerem Becherglas unter dem Abzug (ca. 20 Min.), bis zur Geruchsfreiheit der Lösung (5). Eine leichte Trübung der Lösung wird durch langsames Durchsaugen durch ein feines Glasporenfilter Schott G 5m beseitigt (ca. 1 Tropfen/ 5 Sec) (6).

Die Isolierung von Porphobilinogen und DAL aus der so vorbereiteten Lösung erfolgt durch Adsorption an Jonenaustauscherharz Typ Dowex 2 x 8 bzw. Dowex 50 x 8 und nachfolgende Elution. Nach Laden der Jonenaustauscher - je 2 ml Dowex 2 x 8 u. 50 x 8 in Glassäulen 0,7 x 30 cm unter Glaswollfixierung - entsprechend dem Verfahren von STICH läßt man zur Adsorption von Porphobilinogen eine ca. 2,5 ml Erythrocyten enthaltende Lösung im Anschluß an Vorgang (6) durch eine vorbereitete Dowex 2 x 8 - Säule und eine Weitere völlig gleiche Lösung durch eine vorbereitete Dowex- 50 x 8 - Säule laufen. (Laufgeschwindigkeit ca. 3 ml/ 10 Min.) Nach Waschen der Dowex 2 x 8 - Säule mit 2 x 2 ml aqua dest. wird Porphobilinogen mit 2 ml 1 m Essigsäure und anschließend mit 2 ml 0,2 m Essigsäure eluiert. Die vereinigten Eluate werden auf 5 ml aufgefüllt. Anschließend Zweit-Elution in der gleichen Weise.

Bei beiden Lösungen wird zunächst spektralphotometrisch die "Leerextinktion" bei 555 m µ gemessen (Vergleich zwischen Eluat u. aqua dest.), anschließend je 2 ml Eluat mit 2 ml Ehrlich-Reagens versetzt (1 g Dimethylaminobenzaldehyd in 50 ml 6n HCl) und

die Extinktion nach 5 Min. bei 555 mμ Soretbande spektralphotometrisch bestimmt. Berechnung der Porphobilinogenkonzentration erfolgte aus der Extinktion beider Eluate unter Subtraktion der meist sehr niedrigen und daher oft zu vernachlässigenden halben "Leerextinktion" unter rechnerischer Berücksichtigung der durchschnittlichen (ziemlich konstanten) Verlustquote von 35 %, ermittelt durch Vergleichsproben unter Zusatz von Porphobilinogen zum Erythrocyten-Hämolysat. Da die Extinktionen relativ gering sind, ist für Porphobilinogen entsprechend Eichkurve mit Reinsubstanz nur eine gröbere quantitative Festlegung möglich.

Die Dowex-50 x 8 - Säule mit adsorbierter DAL wird mit 4 x 3 ml aqua dest. gewaschen und mit 3, 5 ml 0, 5 n Na-Acetatlösung vorgespült. Anschließend 2-malige Elution mit je 7 ml 0, 5 n Na-Acetatlösung (Laufgeschwindigkeit 3 ml/10 Min.); Zusatz von je 0, 2 ml Acetylaceton zum Eluat, Auffüllen auf 10 ml mit Acetatpuffer (PH 4, 6); durch Aufenthalt von 10 Min. im kochenden Wasserbad erfolgt Kondensation von DAL zu Pyrrolen, darunter Methyl-3- acetyl-4- (3 - propionsäure) - pyrrol (KNORR-REAKTION). Nach Abkühlung Messung der "Leerextinktion" gegen Vergleichslösung (enthaltend 7 ml 0, 5 n Na-Acetat, 0, 2 ml Acetylaceton und 2, 8 ml Acetatpuffer).

Die "Leerextinktionen" lagen bei präziser Durchführung des Verfahrens - wichtig ist vor allem die Einhaltung der Filtrationsge-

schwindigkeit bei Vorgang (6) - unter 0,001 und erreichten damit unter Anrechnung der halben Leerextinktion durchschnittlich nur 1 % bis 1,5 % der spezifischen Extinktion.

Zur Bestimmung der DAL werden je 2 ml beider Eluate (im Anschluß an KNORR-REAKTION) mit 2 ml modifiziertem Ehrlich-Reagens versetzt (1 g Dimethylaminobenzaldehyd, 8 ml Perchlorsäure zu 70 %, Eisessig ad 50,0) und nach 15 Min. die Extinktion bei 553 mμ spektralphotometrisch gemessen. Die durch KNORR-REAKTION entstandenen Pyrrole werden mit modifiziertem Ehrlich-Reagens zu leuchtend violettrosa Farbstoffen gekoppelt, die ein eng begrenztes spektral-photometrisch deutlich erfaßbares Absorptionsmaximum besitzen. Bei geringer Konzentration an Erythrocyten-DAL weisen die Meßlösungen eine schwache Rosa-Färbung, bei hoher DAL-Konzentration eine intensive Lila-Färbung auf. Quantitative Festlegung der DAL erfolgt durch Subtraktion der halben Leerextinktion (meist zu vernachlässigen) unter rechnerischer Berücksichtigung der durchschnittlichen Verlustquote. Dem Erythrocyten-Hämolysat zugesetzte DAL konnte unter Verlust von durchschnittlich 9,4 % (bei geringer Schwankungsbreite der Verluste) in der Meßlösung wiedergefunden werden.

Stehen nicht genügend Erythrocyten zur getrennten Bestimmung von Porphobilinogen und DAL in Dowex-2 x 8- u. Dowex-50 x 8-Säulen zur Verfügung, so kann man eine Ausgangslösung beide

Säulentypen hintereinander durchlaufen lassen. Die Nachspülflüssigkeit der I. Säule (2 x 2 ml aqua dest) wird ebenfalls auf die 2. Säule gegeben. Bei diesem Vorgehen erhöht sich die DAL-Verlustquote auf durchschnittlich 18,3 %.

Das hier angewandte Verfahren basiert auf der Überlegung, ein vollwertiges Eiweißfällungsmittel einzusetzen, das aus klarer Lösung nach Abtrennung des denaturierten Eiweißes vollständig eliminiert werden kann und somit keine die nachfolgende Adsorption an Jonenaustauscher störenden PH- oder Jonen-Veränderungen entstehen. Besonders bewährt hat sich Aceton wegen guten Fällungsvermögens und hervorragender Flüchtigkeit.

Die Verwendung von Jonenaustauschern besitzt den Vorzug hoher Spezifität bezüglich Adsorption und Elution, den der Elimination störender Stoffe und führt damit zu größter Reinheit der Meßlösung mit der Möglichkeit genauer quantitativer Bestimmung.

β Serum

Zur Bestimmung der Serum-DAL eignet sich das gleiche Verfahren. Abweichend vom Erythrocyten-Verfahren wird eine sofortige Eiweißfällung im unbehandelten Serum vorgenommen (2, 5-faches Vol. Aceton).

Wegen des hohen Bilirubingehaltes des Serums bzw. der säulen-

bereiten Ausgangslösung ist eine Passage beider Säulentypen erforderlich. Bilirubin und andere störende Stoffe werden bereits in der I. Säule (Dowex 2 x 8) adsorbiert. Nach Durchlaufen der I. Säule zeigt sich die Lösung farblos und wasserklar.

Alle übrigen Arbeitsgänge entsprechen dem Erythrocyten-Verfahren.

III ERGEBNISSE

1. PORPHYRINE

a) Erythrocyten-Porphyrin

Erythrocyten-Porphyrin ließ sich aufgrund sehr verschiedener Salzsäurezahlen der Komponenten durch das oben angegebene Verfahren in Kopro- u. Protoporphyrin trennen. Die angewandte Rückextraktion verschleppten Protoporphyrins aus der das Koproporphyrin enthaltenden n/5 HCl mit Chloroform ist von großer Wichtigkeit, da sonst durch Addition der relativ flacheren Protoporphyrinkurve spektralphotometrisch zu hohe Koproporphyrin-Extinktionen gemessen werden. Größere Protoporphyrin-Beimengungen offenbaren sich durch Verschiebung des Extinktionsgipfels, während sie bei der früher üblichen Fluoreszenzmessung verborgen bleiben.

Identifizierung des aus Erythrocyten isolierten
Proto- u. Koproporphyrins erfolgte aufgrund

der Rotfluoreszenz im UV-Licht
der Löslichkeitsverhältnisse (Lösl. in den üblichen LÖS.-Mitteln wie ACETON, AETHER, AETHYLACETAT, verschiedenes Verhalten gegenüber Chloroform)
des spektralphotometrischen Kurvenverhaltens (Steilheit, Extinktionsmaximum im sichtbaren u. kurzwelligen Bereich)

der Wanderungseigenschaften im Papierchromatogramm nach KEHL - STICH und CHU.

Aus Einzelproben isoliertes Protoporphyrin zeigte folgende EIGENSCHAFTEN:

Deutliche ROTFLUORESZENZ im UV-Licht

Hohe SALZSÄURE - ZAHL (um 2,0)

Löslichkeit in ACETON, AETHER, AETHYLACETAT u. CHLOROFORM

Spektralphotometrische Absorptionsmessung: charakteristische BREITBASIGE KURVE, typische Lage des EXTINKTIONSMAXIMUMS in verschiedenen HCl-Konzentrationen (5 % HCl: 407 - 408 mμ , Abb. 1) typisches chromatographisches Verhalten bezügl. FLUORESZENZ-INTENSITÄT, FLECKBILDUNG und WANDERUNGSSTRECKE (Abb. 2 u. Abb. 8)

Chromatographie nach KEHL-STICH: Rf = 0,72 - 0,76

Chromatographie nach CHU: Rf = 0,83 - 0,87

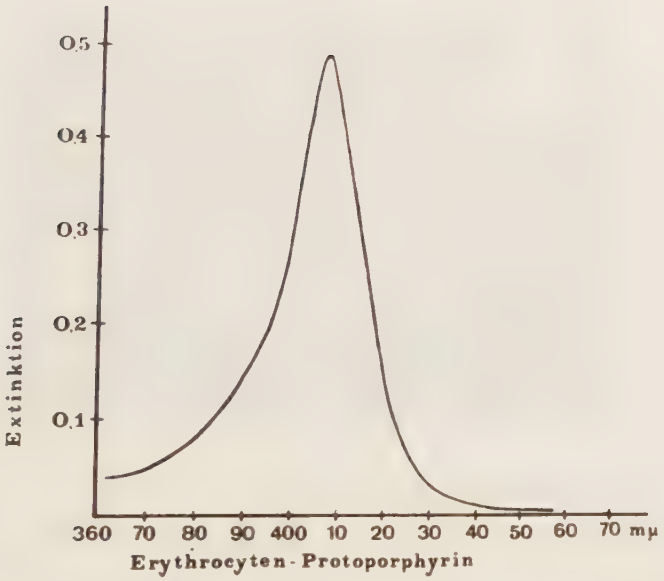

Abb. 1 Erythrocyten-Protoporphyrin; Soret-Bande in 5 % HCl; Abscisse: Wellenlänge; Ordinate: Extinktion.

Koproporphyrin I u. III, vorwiegend aus Einzelproben isoliert, wurde durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

Intensive ROTFLUORESZENZ im UV-Licht

Niedrige SALZSÄUREZAHL (um 0,1)

Löslichkeit in ACETON, AETHER, AETHYLACETAT, unlöslich in CHLOROFORM

Spektralphotometrisch: SCHMALBASIGE charakteristische Kurve typische Lage des EXTINKTIONSMAXIMUMS (5 % HCl: 402 m) (Abb. 3)

Chromatographisch (Abb. 2 und Abb. 4): typisches Verhalten bezüglich FLUORESZENZINTENSITÄT, FLECKBILDUNG und WANDERUNGSSTRECKE

Chromatographie nach KEHL-STICH:	Rf = 0,45 - 0,49	
Chromatographie nach CHU:	Rf = 0,45 - 0,48	Koprop. methyl-ester I
	Rf = 0,67 - 0,72	Koprop. methyl-ester III

Abb. 2 Chromatogramm nach KEHL-STICH:
von links nach rechts: Erythrocyten-Koproporphyrin, Koproporphyrin-Kontrollprobe, Serum-Koproporphyrin, Erythrocyten-Protoporphyrin.

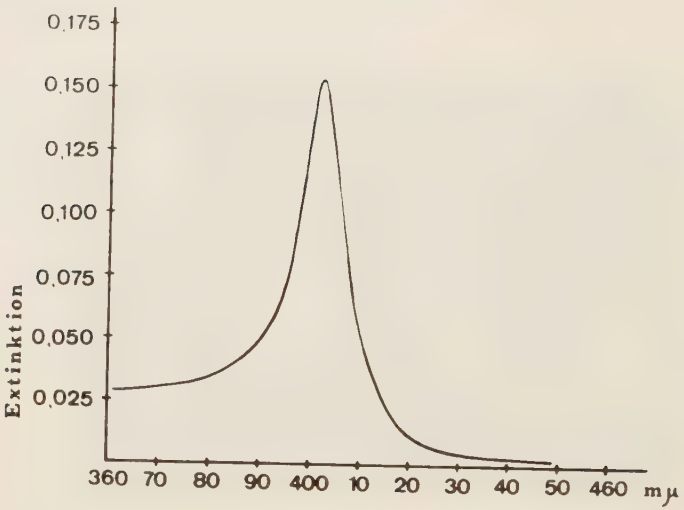

Abb. 3 Erythrocyten-Koproporphyrin; Soret-Bande in 5 % HCl. Abscisse: Wellenlänge; Ordinate: Extinktion.

Quantitative Ergebnisse:

Erythrocyten-Porphyrinwerte mit Angabe der Standardabweichung (σ); in Klammern Extremwerte:

Protoporphyrin-Mittelwert: 61,4 γ% (19,7 - 178,5)
$\sigma = \pm$ 32 γ %

Koproporphyrin-Mittelwert: 1,50 % (0,87 - 3,40)
$\sigma = \pm$ 0,45γ %

Sämtliche Angaben beziehen sich auf Einzelproben.
2/3 der Protoporphyrinwerte lagen zwischen 30 γ % und 75 γ %;
4/5 der Koproporphyrinwerte lagen zwischen 1,0 γ % und 2,0 γ %;
die Streubreite der Protoporphyrinwerte war, wie auch aus den mittleren Standardabweichungen hervorgeht, größer als die des Koproporphyrins.

Bei der Bearbeitung von Sammelproben nach dem von CLOTTEN angegebenen Verfahren zur Gewinnung von Uroporphyrin aus Erythrocyten (siehe Technik) - das Bleiacetat-Verfahren von BRUGSCH eignete sich nicht wegen der intensiven Adsorption von Verunreinigungen an Bleiphosphat - konnten spektralphotometrisch geringe Porphyrinmengen nachgewiesen werden mit einem Absorptionsmaximum von 405 - 406 mμ in 10 % HCl. Es dürfte sich dabei um Spuren von Uroporphyrin bzw. dem Uroporphyrin nahestehender Porphyrine mit hoher Carboxylgruppenzahl handeln.

Für eine chromatographische Identifizierung reichten die verfügbaren Mengen nicht aus.

In mehreren Chromatogrammen nach CHU fiel ein fluorescierender Porphyrin-Fleck unterhalb des Erythrocyten-Koproporphyrin I auf (Abb. 4), der auch bei der Chromatographie des SERUM-Koproporphyrins sowie in schwacher Form in einer Koproporphyrin-Vergleichsprobe mit Koproporphyrin aus dem Harn eines Porphyriekranken zur Darstellung kommt.

Entsprechend den Ergebnissen der Chromatographie von Zwischenporphyrinen nach CHU dürfte es sich um Pentacarboxyl-Porphyrin I handeln, das sich bei günstiger Ausgangsmenge infolge etwas geringerer Rf-Werte von Koproporphyrin I abtrennt.

Das in biologischem Material nachgewiesene dazu korrespondierende Pentacarboxyl-Porph. III dürfte sich infolge ungünstiger Mengenrelation nicht von Koprop. III getrennt haben. Aufgrund des geringen Vorkommens können keine Mengenangaben gemacht werden.

Abb. 4 Chromatogramm nach CHU.
links Serum-, rechts Erythrocyten-Koproporphyrin,
in der Mitte Koproporphyrin-Kontrolle (Porphyrie).

Von oben nach unten:
Koproporphyrin III, Koproporphyrin I,
Pentacarboxyl - Porphyrin.

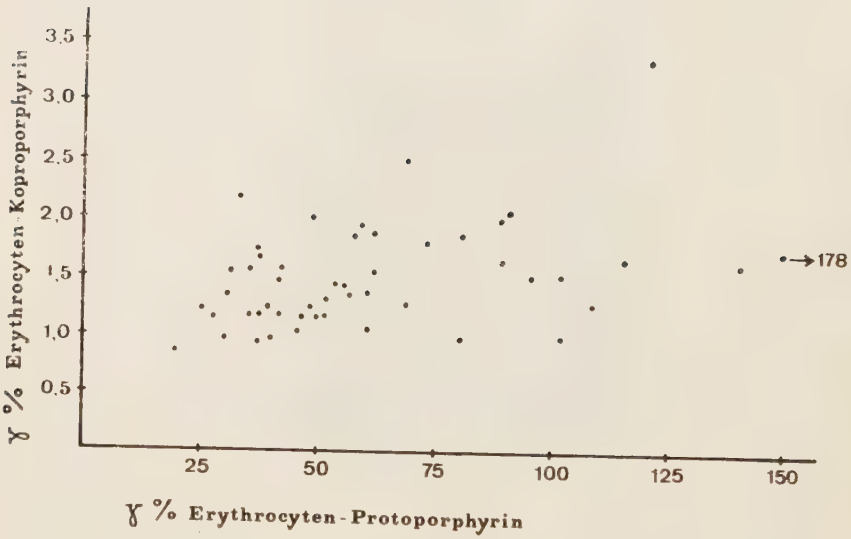

Abb. 5 Relation zwischen Erythrocyten-Protoporphyrin und Erythrocyten-Koproporphyrin (Einzelproben)

b) Serum

Mithilfe des oben angegebenen Verfahrens erfolgte eine Trennung in Porphyrin niedriger HCl-Zahl (entsprechend Koproporphyrin) und Porphyrin hoher HCl-Zahl.

In der Fraktion mit niedriger HCl-Zahl konnte in mehreren Einzel- und Sammelproben Koproporphyrin (Substanz aus mehreren Einzelproben stammend), aus jener mit hoher HCl-Zahl in Sammelproben Protoporphyrin nachgewiesen werden.

Beide Porphyrine zeigten die für sie typischen Eigenschaften der Fluoreszenz, des HCl-Verhaltens, der Spektralphotometrie und Chromatographie.

Aufgrund verfeinerter Arbeitsmethodik und Meßtechnik konnte der Koproporphyrin- und Protoporphyringehalt jeder Einzelprobe genau bestimmt werden. Wir fanden in allen Serum-Proben in ähnlicher Relation wie in Erythrocyten Koproporphyrin I und III (chromatographischer Nachweis als Methylester nach CHU) und Protoporphyrin (spektralphotometrisch typische Gipfelbildung in Einzel- und Sammelproben bei 407 mμ in 7,5 % HCl; chromatographischer Nachweis nach CHU als Methylester aus Sammelproben).

Serumporphyrin-Werte mit Angabe der Standardabweichung (σ); in Klammern Extremwerte:

Koproporphyrin-Mittelwert: 0,48 γ % (0,24 - 1,32)

$\sigma = \pm$ 0,23 γ %

Protoporphyrin-Mittelwert: 0,33 γ % (0,1 - 0,89)

$\sigma = \pm$ 0,17 γ %

Gesamt-Porphyrin-Mittelwert: 0,81 γ % (0,39 - 2,15)

3/4 der Koproporphyrin-Werte lagen zwischen 0,3 γ % und 0,65 γ % ;

3/4 der Protoporphyrin-Werte lagen zwischen 0,2 γ % und 0,50 γ %;

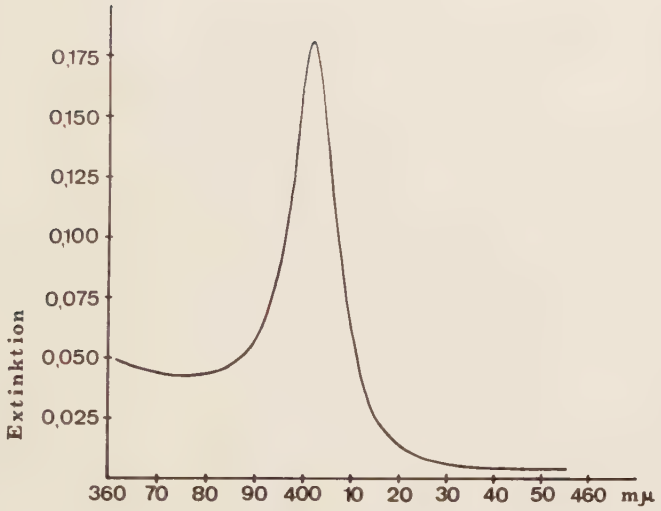

Abb. 6 Serum-Koproporphyrin (Einzelprobe);
Soretbande in 5 % HCl.
Abscisse: Wellenlänge; Ordinate: Extinktion

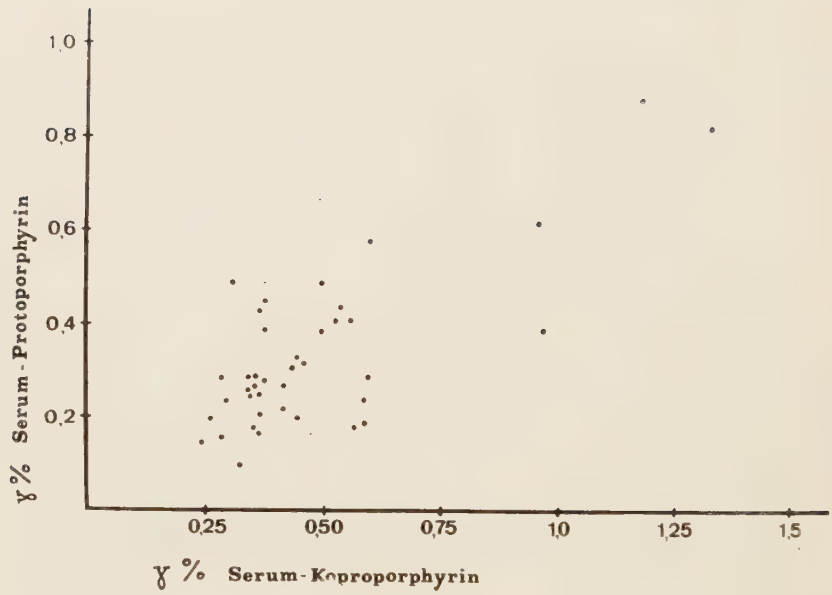

Abb. 7 Relation zwischen Serum-Kopro- u. Serum-Protoporphyrin (Einzelproben)

2. PORPHYRINVORSTUFEN

a) Erythrocyten

In sämtlichen Einzelproben (40) konnte Porphobilinogen und DAL gefunden werden.

Der Nachweis von Porphobilinogen u. DAL stützt sich auf die hohe Spezifität der Gewinnungsmethode (Adsorption an Jonenaustauscher und Elution unter speziellen Bedingungen) und der Messung (spektralphotometrisch nach Koppelung der Vorstufen bzw. deren Reaktionsprodukte zu einem Farbstoff mit charakteristischem Absorptionsmaximum). DAL besitzt noch die kennzeichnende Eigenschaft, mit Acetylaceton Pyrrole zu bilden (KNORR-Reaktion), die mit modifiziertem Ehrlich-Reagens zu einem violetten Farbstoff reagieren, der spektralphotometrisch eine spezifische Absorptionskurve ergibt (Abb. 9).

Der DAL-Gehalt lag zumeist so hoch, daß die Meßlösung eine leichte bis intensive Violettfärbung aufwies.

Porphyrin-Vorstufen in Erythrocyten mit Angabe der Standardabweichung; in Klammern Extremwerte

DAL-Mittelwert:	74,3 γ %	(37,1 - 176,2)
	σ = ± 35 γ %	
Porphobilinogen-Mittelwert:	45,2 γ %	(23 - 71)
	σ = ± 12 γ %	

Abb. 8 Chromatogramm nach CHU
links Serum-Protoporphyrin aus Sammelprobe;
rechts Erythrocyten-Protoporphyrin aus Einzelprobe

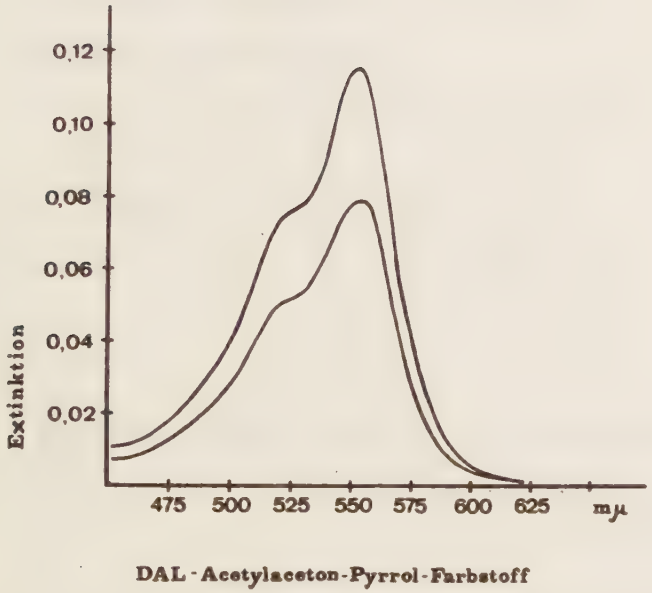

Abb. 9 Absorptionskurven nach Koppelung von δ -Amino-lävulinsäure-Pyrrol (nach Knorr-Reaktion) mit modif. Ehrlich-Reagens.
Obere Kurve: Erythrocyten- δ -Aminolävulinsäure;
untere Kurve: δ-Aminolävulinsäure-Reinsubstanz.

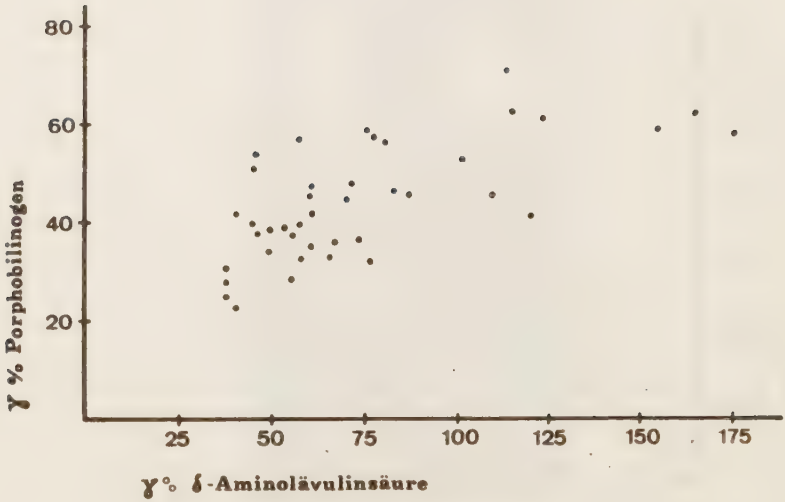

Abb. 10 Relation zwischen Erythrocyten-Porphobilinogen u. Erythrocyten- δ -Aminolävulinsäure.

b) Serum

In allen Proben konnte DAL in kleiner Menge nachgewiesen werden. Die bei dem Porphobilinogen-Verfahren inkonstant aufgetretenen minimalen Extinktionen erlauben keinen sicheren Nachweis von Porphobilinogen im Serum.

Serum-DAL-Werte mit Angabe der Standardabweichung (σ)
in Klammern Extremwerte:

DAL-Mittelwert: 4,6 γ % (2,6 - 7,4)

$\sigma = \pm$ 1,2 γ %

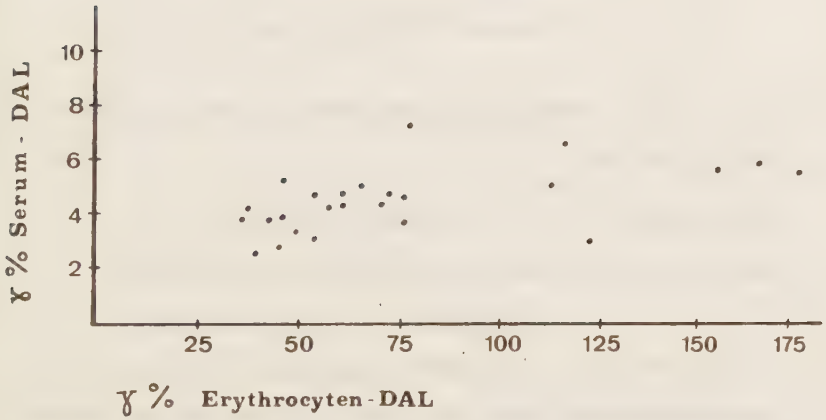

Abb. 11 Relation zwischen Erythrocyten- δ-Aminolävulinsäure und Serum- δ-Aminolävulinsäure (Einzelproben)

3. VERGLEICH

Die in 50 Fällen aus den Erythrocyten des Nabelvenenblutes gewonnenen Proto- u. Koproporphyrin-Mengen zeigen völlige bzw. weitgehende Übereinstimmung mit den Werten von HSIA u. PAGE, die 1954 in 24 Fällen den Proto- und Koproporphyringehalt von Nabelvenenblut-Erythrocyten Neugeborener bestimmten.

HSIA u. PAGE:	PROTOPORPHYRIN-Mittelwert	86 γ % (± 37)
	KOPROPORPHYRIN-Mittelwert	1,5 γ % (± 0,7)
Eigene Ergebn.:	PROTOPORPHYRIN-Mittelwert	61,4 γ % (± 32)
	KOPROPORPHYRIN-Mittelwert	1,50γ % (± 0,45)

(In Klammern SIGMA-Grenzen)

FIKENTSCHER bestimmte 1935 aetherlösliches Gesamt-Porphyrin im Serum Neugeborener:

FIKENTSCHER: 1 - 3 γ% SERUM-Porphyrin.

Eigene Ergebnisse: Mittelwert: 0,81 γ % (0,4 - 2,15)

(41 Proben)

Ein Vergleich von Serum-Koproporphyrin und Serum-Protoporphyrin, Porphobilinogen und DAL in Erythrocyten und Serum von Neugeborenen ist aufgrund fehlender Voruntersuchungen nicht möglich.

Von besonderer Bedeutung ist die quantitative Abweichung des HÄMPRÄKURSORENMUSTERS NEUGEBORENER von dem gesunder ERWACHSENER.

Von verschiedenen Untersuchern wurden folgende Durchschnittswerte bei gesunden Erwachsenen ermittelt:

Protoporphyrin:

WATSON: ♂ 28,5 γ % ♀ 41 γ %

SCHWARZ u. WIKOFF 13 γ %

SCHWARZ-BERG-BOSSENMEIER-DINSMORE: 25 - 50 γ %

CLOTTEN (modif. Verfahren nach SCHWARZ-WIKOFF): 34,7 γ %

Koproporphyrin:

WATSON: ♂ 0,3γ % ♀ 0,7γ %

CRAMER, CARTWRIGHT, WINTROBE: ♂ 0,79γ % ♀ 0,71γ %

SCHWARZ u. WIKOFF: 0,3 γ %

Durch Verarbeitung gleicher Proben nach bekannten Verfahren und der bei den eigenen Untersuchungen angewandten Methode konnte festgestellt werden, daß die Protop.-Werte fast völlig identisch waren. Die Koprop.-Werte zeigten etwas größere Unterschiede, jedoch zumeist keine massiven Abweichungen.

Einige nach dem eigenen modifizierten Verfahren bearbeitete Proben gesunder Erwachsener stimmten mit den Durchschnittswerten anderer Verfahren für Kopro- und Protoporphyrin überein (26γ % Protoporphyrin, 0,7 γ % Koproporphyrin).

Zum Vergleich der Vorstufen in Erythrocyten stehen Angaben von CLOTTEN (CLOTTEN-Verfahren) über Durchschnittswerte gesunder Erwachsener zur Verfügung:

CLOTTEN: DAL-Mittelwert 30,9 γ %; Porphobil.: 26,9 γ %

Ähnliche Werte lieferte die Untersuchung einiger Proben gesunder Erwachsener nach eigenem Verfahren.

DAL: 15 - 30 γ % ; Porphobilinogen: 12 - 25 γ %

Ein Vergleich zwischen Serum-Porphyrin von Neugeborenen und Serum-Porphyrin Erwachsener muß unterbleiben, da ein sicherer Porphyrinnachweis im Serum Erwachsener unter physiologischen Verhältnissen noch nicht gelang.
Für Vergleiche der Vorstufen im Serum Neugeborener und Erwachsener fehlen entsprechende Voruntersuchungen.

SÄMTLICHE HÄMPRÄKURSOREN IN DEN ERYTHROCYTEN NEUGEBORENER ZEIGEN SOMIT DEUTLICHE QUANTITATIVE ABWEICHUNGEN VON DEN MITTELWERTEN GESUNDER ERWACHSENER.

DIE EINZEL- UND MITTELWERTE VON PROTO-, KOPRO-PORPHYRIN, δ - AMINOLÄVULINSÄURE UND PORPHOBILINOGEN NEUGEBORENER BETRAGEN ETWA DAS 2 - 3 FACHE DER WERTE GESUNDER ERWACHSENER.

Dabei bestehen auch verschieden deutliche quantitative BEZIEHUNGEN DER HÄMPRÄKURSOREN UNTEREINANDER und zur RETICULOCYTENZAHL. Eine auffallende Parallelität besteht zwischen Reticulocyten-Zahl und Erythrocyten-Koproporphyrin (Abb. 12), eine gewisse Parallelität auch zwischen Reticulocyten-Zahl und Erythrocyten-δ -Aminolävulinsäure (Abb. 13).
Eine mehr oder weniger deutliche Mengen-Korrelation zeigen auch
Erythrocyten-Koprop. u. Erythr.-Protop. (Abb. 5)
Erythr.-Koprop. u. Erythr.-DAL (Abb. 14)
Erythroc.-DAL u. Erythr.-Porphobil. (Abb. 10)
Erythrocyten-Koprop. u. Serum-Koprop. (Abb. 15)
Serum-Protop. u. Serum-Koprop. (Abb. 7).

Deutliche Beziehungen zum Hb-Gehalt bestanden nicht.
Die geringen bis mäßigen GESCHLECHTSUNTERSCHIEDE besitzen wegen der Probenzahl keine Allgemeingültigkeit.

Erythrocyten-	Koprop.	Protop.	DAL	Porphobil.	
♂	1,67	64,37	92	49	γ %
♀	1,35	58,8	60	42	
Serum -					
♂	0,56	0,35	5,1		γ %
♀	0,41	0,31	4,1		

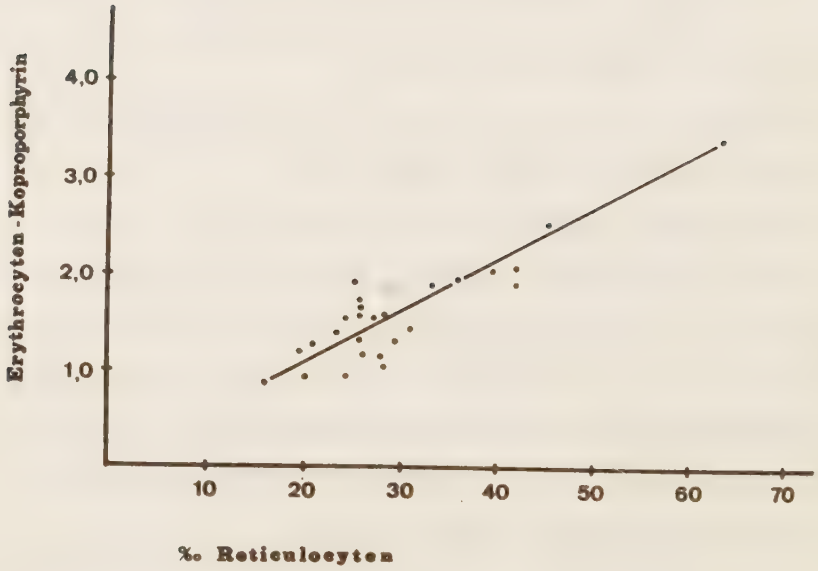

Abb. 12 Parallelität zwischen Reticulocyten und Erythrocyten-Koproporphyrin

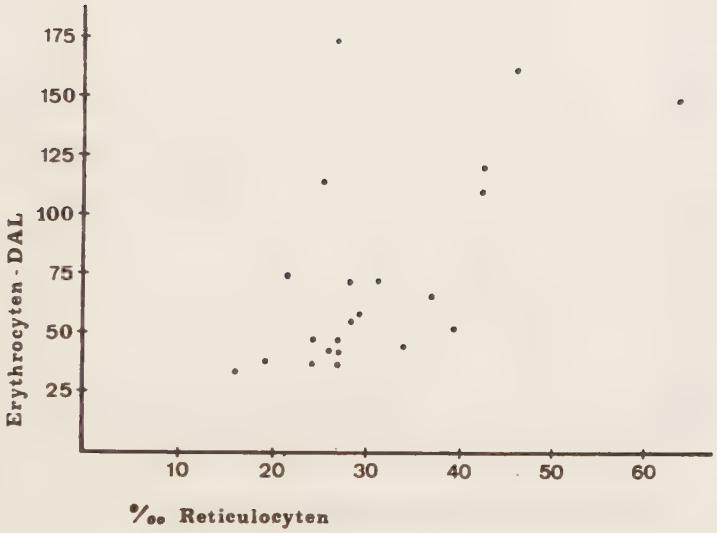

Abb. 13 Parallelität zwischen Reticulocyten und Erythrocyten- δ -Aminolävulinsäure

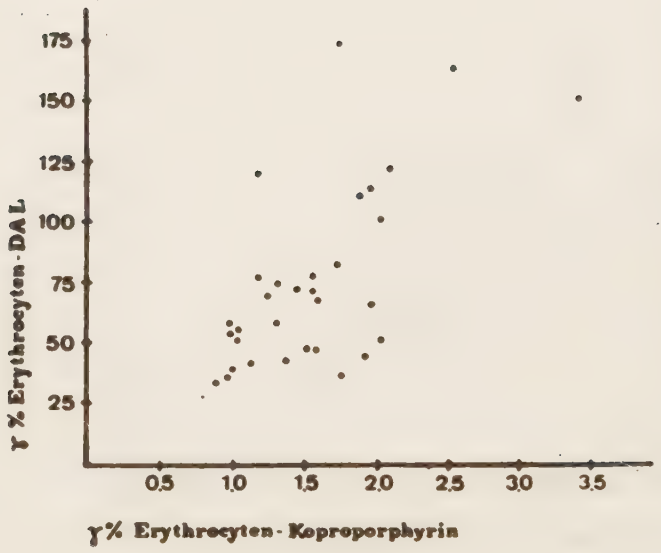

Abb. 14 Relation zwischen Erythrocyten-Koproporphyrin und Erythrocyten- δ -Aminolävulinsäure

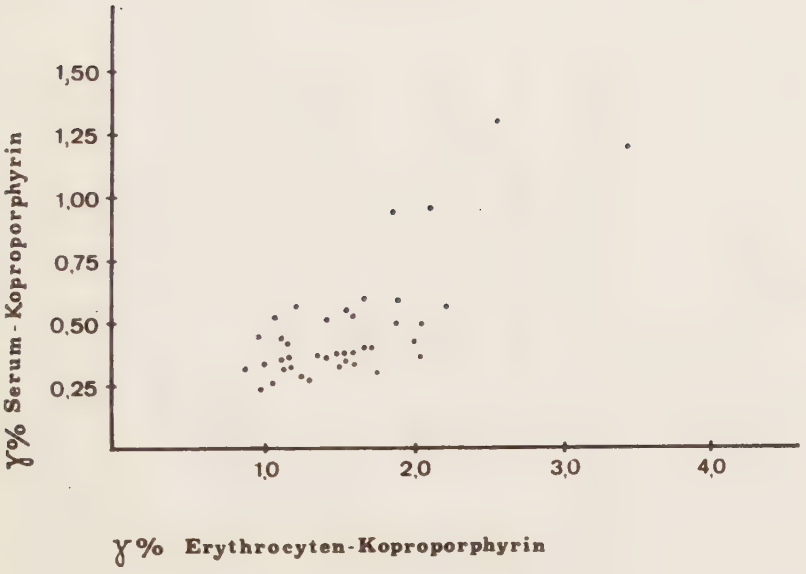

Abb. 15 Relation zwischen Erythrocyten-Koproporphyrin und Serum-Koproporphyrin

Tabellarische Übersicht der Ergebnisse:

Proben-nummer		Retic. ‰	Ery-Proto	Ery-Kopro	DAL γ	Porphob. %	Ser. Kopro	Ser. Proto	Ser. DAL	Besondere
1	♂		30,47	1,35	-	-	0,51	0,2	-	
2	♀		55,03	1,43	-	-	0,35	0,29	-	
3	♂		27,29	1,17	-	-	0,34	0,25	-	
4	♀		57,10	1,86	-	-	0,58	0,24	-	
5	♀		32,88	2,19	-	-	0,56	0,18	-	
6	♂		35,26	1,18	-	-	-	-	-	
7	♀		140,34	1,64	109,3	46	-	-	-	
8	♀		37,03	1,68	-	-	0,41	0,22	-	
9	♀		41,17	1,48	57,6	33	0,35	0,27	-	Anfang mens X
10	♂	23	59,84	1,38	-	-	-	-	-	
11	♂		36,50	1,71	83,4	47	0,41	0,27	-	
12	♀		80,10	0,98	64,7	33	-	-	-	
13	♂		48,04	2,02	101,8	53	0,37	0,28	-	reif, mul tiple In- farkte
14	♂		36,90	1,18	120,6	42	0,36	0,25	-	
15	♀	21	108,85	1,28	75,4	58	0,28	0,29	3,8	rechneris Übertrag ne klinis Zeichen
16	♂	26	178,51	1,75	37,1	26	0,30	0,49	-	

Proben-nummer	Retic. ‰	Ery-Proto	Ery-Kopro	DAL γ	Por-phob. %	Ser. Kopro	Ser. Proto	Ser. DAL	Besonderes
17 ♂	46	68, 42	2, 52	165, 3	64	1, 32	0, 83	6, 1	klin. Übertr.-zeichen
18 ♀	24	37, 27	0, 95	37, 2	31	0, 45	0, 32	4, 2	
19 ♀	28	59, 70	1, 06	56, 4	58	0, 52	0, 41	4, 3	
20 ♀	27	49, 11	1, 16	59, 6	46	0, 49	0, 39	4, 8	
21 ♂	25	79, 76	1, 87	115, 3	63	0, 59	0, 58	6, 8	
22 ♀	27	41, 70	1, 58	48, 3	39	0, 34	0, 29	3, 4	
23 ♂	42	72, 63	1, 81	112, 8	71	0, 95	0, 62	5, 2	
24 ♂	20	30, 02	0, 98	39, 3	42	0, 24	0, 15	2, 6	
25 ♂	28	30, 81	1, 56	72, 2	37	0, 44	0, 20	4, 8	Anf. mens X
26 ♀		101, 37	0, 99	55, 2	38	0, 34	0, 26	5, 1	
27 ♀		45, 03	1, 04	53, 3	29	0, 26	0, 20	3, 1	
28 ♀	27	46, 08	1, 16	42, 6	40	0, 44	0, 33	3, 8	
29 ♂	26	115, 44	1, 67	176, 2	59	0, 59	0, 29	5, 8	
30 ♀	26	34, 70	1, 58	69, 4	55	0, 37	0, 45	4, 5	reif, reichl. Infarkte
31 ♀		50, 6	1, 17			0, 36	0, 43	-	
32 ♀		39, 51	0, 98	58, 7	42	-	-	-	
33 ♀		68, 06	1, 24	87, 3	46	-	-	-	
34 ♂		88, 50	1, 65	-	-	-	-	-	
35 ♀		101, 14	1, 52	59, 6	47	0, 55	0, 41	-	
36 ♀		60, 89	1, 55	79, 7	57	0, 53	0, 44	-	

Proben-nummer		Retic. ‰	Ery-Proto	Ery-Kopro	DAL γ	Por-phob. %	Ser. Kopro	Ser. Proto	Ser. DAL	Besonderes
37	♀		38,30	1,24	71,8	48	0,28	0,24	-	
38	♀	16	19,70	0,87	34,7	28	0,32	0,10	3,9	
39	♀	39	88,05	2,02	52,6	39	0,49	0,49	4,7	reif, reichl. Infarkte
40	♂	63	119,74	3,40	153,2	61	1,17	0,89	5,9	rechnerisch u. klin. Übertrag. massive Plac. infarzierung
41	♂	33	60,97	1,88	45,4	39	-	-	5,3	
42	♀		47,44	1,25	40,1	23	-	-	-	
43	♂		41,20	1,18	44,0	55	0,35	0,18	3,9	
44	♂	31	53,05	1,45	73,8	58	0,28	0,16	4,7	reif, reichl. Infarkte
45	♀		55,96	1,35	43,1	52	0,36	0,21	2,9	
46	♂	42	89,49	2,08	122,7	62	0,96	0,39	3,1	klin. Übertragungs-zeich.
47	♀	29	50,78	1,32	59,9	36,5	0,37	0,39	4,4	
48	♂	24	94,88	1,52	48,4	35,5	0,36	0,17	-	
49	♂	37	58,48	1,95	66,4	36	0,43	0,31	-	reif, reichl. Infarkte
50	♂	19	24,30	1,22	76,5	32	0,58	0,19	7,4	reif, reichl. Plac. infarkte.

IV BESPRECHUNG

Mithilfe der angegebenen, zum Teil neu entwickelten Methoden war es möglich, Einblick in das HÄMPRÄKURSOREN-MUSTER des Neugeborenen-Blutes zu gewinnen und daran den Versuch zu schließen, die Ergebnisse zu interpretieren.

Die beim Erwachsenen im peripheren Blut nachgewiesenen Hämpräkursoren konnten auch im Nabelvenenblut von Neugeborenen aufgefunden werden. Es bestehen somit keine qualitativen Unterschiede. Erheblich sind jedoch die quantitativen Abweichungen. Sämtliche Hämpräkursorenwerte betragen beim Neugeborenen das 2 - 3-fache des Erwachsenen.

In Übereinstimmung mit der bei Neugeborenen im peripheren Blut meist auf über 20 ‰ erhöhten Reticulocytenzahl - nach neueren Untersuchungen sind nur die fermentaktiven jungen Blutzellen, Reticulocyten und Erythroblasten (letztere treten unter physiologischen Verhältnissen nur in den ersten fetalen Monaten im peripheren Blut auf), zum Aufbau der Hämpräkursoren befähigt - besteht eine relativ zum Blutvolumen verstärkte Erythropoese, Hämsynthese und allgemeine Vermehrung der Hämpräkursoren im peripheren Blut.

Von ursächlicher Bedeutung dürften vorwiegend folgende Faktoren sein:

1. Verkürzte Lebensdauer der Erythrocyten (GILARDI u. MIESCHER) : ca 2/3 der Erwachsenenlebensdauer

2. Im Zusammenhang mit dem intensiven Wachstum über den Blutersatz hinausgehende Blut-Neubildung

3. Erhöhte Fragilität von Neugeborenen- u. Säuglings-Erythrocyten (GOLDBLOOM, DESFARGES, O CONNEL)

Zusätzlich könnte in einigen Fällen durch Placentar-Insuffizienz, Placenta-Infarzierung und toxisch-hämolytische Vorgänge eine Steigerung der Erythropoese angeregt werden.

Eine sehr deutliche Parallelität im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen zu der Reticulocytenzahl zeigt Koproporphyrin, weniger eng ist die Beziehung zwischen Reticulocyten und den übrigen Stoffen des Hämpräkursorenmusters. Auf die Parallelität zwischen Reticulocytenzahl des peripheren Blutes und Koproporphyrin in Erythrocyten unter pathologischen Verhältnissen wurde erstmals von WATSON hingewiesen; zu gleichen Ergebnissen kamen SCHWARZ u. WIKOFF, PRATO und CLOTTEN.

Einige Fällelmit hohen Porphyrinkonzentrationen veranlaßten zur Suche nach pathologischen Begleitumständen. Dabei ergaben sich Hinweise auf verstärkte Erythropoese mit Vermehrung der Hämpräkursoren, vor allem des Koproporphyrins, bei ausgeprägten Rückbildungserscheinungen der Placenta, unter anderem auch bei Übertragung.
Die beiden Fälle (Nr. 17 u. 40), deren Koproporphyrinwerte oberhalb der 2 σ-Abweichung lagen (Nr. 17: 2,52 γ %), Nr. 40 : 3,4 γ %) wiesen auch Zeichen verstärkter Erythropoese auf (Nr. 17 : 46 ‰ Retic., Nr. 40: 63 ‰ Retic.) bei gleichzeitiger, z.T. erheblicher Erhöhung aller

Hämpräkursoren in Erythrocyten (Nr. 17 : Protop. 68,4, DAL 165,3, Porphobilinogen: 64 ; Nr. 40: Protop. 119,7, DAL 153,2 Porphobil. 61). Auch die SERUM-Porphyrine lagen weit über dem Durchschnitt.

Fall 17 lag rechnerisch an der Grenze zur Übertragung, trug jedoch deutliche klinische Zeichen von Übertragung (eine Angabe über Placenta-Infarkte fehlt),

Fall 40 überschritt rechnerisch den Geburtstermin um 30 Tage, zeigte ausgeprägt die Zeichen klinischer Übertragung, z.T. im Zusammenhang mit Störung der Placentafunktion (Überlänge, Hautmazeration, fehlende Vernix u. Lanugo u.a.), Hinweise auf schwere intrauterine Beeinträchtigung des kindlichen Wohlbefindens vorwiegend im Sinne einer Hypoxie (grünes, mekoniumhaltiges Fruchtwasser), erklärbar durch massive Infarzierung der gesamten Placenta.

Ein weiterer Fall klinischer Übertragung (mit Zeichen intrauteriner Hypoxie - grünes, mekoniumhaltiges Fruchtwasser), war begleitet von einer Reticulocytose (42 ‰) sowie Koproporphyrinvermehrung auf 2,08 Y % bei allgemein erhöhtem Hämpräkursorenmuster.

3 von 6 weiteren Fällen mit reichlich Infarktbildung in der Placenta, die jedoch alle Zeichen der Reife aufwiesen, zeigten deutlichen Koproporphyrin- u. Reticulocytenanstieg (Koprop. 1,95 bis 2,02, Reticulocyten 37 - 39).

1 Fall rein rechnerischer Übertragung ohne klinische Zeichen sowie 2 Fälle mit vorzeitigem Geburtstermin (Anfang mens X), wiesen normale Werte auf.

Bisherige Untersuchungen über die Erythropoeseaktivität bei Übertragung Neugeborener ohne Berücksichtigung des Hämpräkursorenmusters förderten widersprüchliche Ergebnisse:

WALKER u. TURNBULL beschrieben einen Hb-Anstieg bei Übertragung, Placenta praevia und Präeklampsie;
SCHWENZER sah vermehrt Erythroblasten im Blut übertragener Neugeborener;
DRESCHER, ROOTH u. MARKS fanden keine Differenz der Blutwerte von normal und übertragen Geborenen.

Von ursächlicher Bedeutung für die bei eigenen Fällen beobachtete Steigerung der Erythropoese mit Vermehrung der Hämpräkursoren ist möglicherweise nicht die Tatsache der Übertragung unmittelbar, sondern die bei Übertragung gehäuft, jedoch auch bei rechtzeitig Geborenen bisweilen auftretenden Rückbildungserscheinungen mit Infarktbildung der Placenta. Makroskopisch erkennbare Placentaveränderungen erlauben sicherlich nur unzuverlässige Rückschlüsse auf die Placentafunktion.

Ein Zusammenhang zwischen deutlichen Rückbildungserscheinungen der Placenta und Erhöhung der erythropoetischen Aktivität mit Vermehrung der Hämpräkursoren ist wahrscheinlich, doch können sichere Aussagen im Hinblick auf die geringe Anzahl der Fälle nicht gemacht werden.

Die Beobachtung hoher Einzelwerte von Protoporphyrin mit mäßiger, z. T. auch fehlender Erhöhung von Koproporphyrin bei hoher Variabilität der Werte (relativ hohes δ) ohne Reticulocytenerhöhung und Fehlen deutlicher

klinischer Eisenmangel-Zeichen spricht für einen im Neugeborenen-Status verbreiteten, gehäuft auftretenden Zustand latenten Eisenmangels mit Hemmung des Eisen-Einbaues in den Porphyrinring. Dabei tritt inkonstant infolge direkten oder indirekten Blocks auch eine Vermehrung der vorangehenden Vorstufen auf. Ähnliche Deutung der Neugeborenen- Protoporphyrinwerte findet sich bei HSIA u. PAGE.

Zur Herkunft des im Serum nachgewiesenen Porphyrins ist folgendes zu vermerken:

Die vor allem bei höheren Konzentrationen deutliche Beziehung zwischen Erythrocyten-Koproporphyrin und Serum-Koproporphyrin spricht für eine die hepatische überragende Abgabe von Koproporphyrin an das Serum im Gefolge der Erythropoese.
Die relativ gute Übereinstimmung der Serum- u. Fruchtwasser-Koproporphyrinwerte Neugeborener (letztere von FIKENTSCHER, M. SCHMIDT u. STICH 1964/65 bestimmt) kann die Annahme stützen, daß das Fruchtwasserporphyrin (Koproporphyrin) zumindest vorwiegend aus dem Blut-Plasma stammt und durch Plasma-Filtration durch allantochoriale Gefäße (Fruchtwasserentstehung: HUBER u. KÖHN) infolge guter Löslichkeit im wässerigen Medium Bestandteil des Fruchtwassers wird.
Die relativ hohen Protoporphyrinwerte im Serum Neugeborener finden in der Annahme der Entstehung durch Hämolyse keine ausreichende Erklärung. Unter Zugrundelegen des durchschnittlichen Erythrocyten-Protoporphyrins von ca. 60 γ % müßte zum Erreichen der durchschnittlichen Serum-Protoporphyrinwerte von 0,33 γ % Erythrocyten im Verhältnis von 1 : 190 zum

Serum hämolysieren. Eine Hämolyse von 1:1000 bis 1:500 ist jedoch deutlich erkennbar. Die Serum-Werte liegen demnach beim 3 bis 5-fachen (teilweise bis zum 7 fachen) des durch unbemerkte Hämolyse erklärbaren. Ob das Vorkommen von Serum-Protoporphyrin auf die Neugeborenenperiode beschränkt ist (erhöhte Fragilität der Erythrocyten bei mangelhafter Abbaufähigkeit des RES ? - eine gewisse Parallelität von Serum-Proto- und Serum-Koproporphyrin könnte im Sinne der oben angegebenen Zusammenhänge als indirektes Zeichen verstärkter erythropoetischer Aktivität infolge gesteigerter Hämolyse gewertet werden), läßt sich wegen Fehlens entsprechender Vergleichsuntersuchungen nicht angeben.

Der konstante Nachweis geringer Mengen von Dicarboxylporphyrin im Harn Erwachsener macht das generelle Vorkommen von Protoporphyrin im Serum wahrscheinlich.

V ZUSAMMENFASSUNG

Das Hämpräkursorenmuster des Neugeborenenblutes wurde erstmals mit neueren modifizierten und zum Teil neu entwickelten Methoden analysiert.

Durch Bestimmung der wesentlichen Zwischenprodukte und Nebenprodukte der Hämsynthese (Proto- und Koproporphyrin, Porphobilinogen und δ -Aminolävulinsäure) und Paralleluntersuchung von Erythrocyten und Serum war es möglich, einen Überblick über das Hämpräkursorenmuster des Neugeborenenblutes zu gewinnen. Chromatographisch regelmäßig nachweisbar waren die Isomeren I und III des Koproporphyrins in Erythrocyten und Serum; in mehreren Chromatogrammen kam ein Pentakarboxylporphyrin I aus Erythrocyten und Serum zur Darstellung. Es konnten erstmals Porphobilinogen und δ -Aminolävulinsäure in Neugeborenenerythrocyten und Protoporphyrin und δ-Aminolävulinsäure im Serum nachgewiesen werden.

Die Bedeutung der Hämpräkursoren im menschlichen Neugeborenenblut und ihre Beziehungen zur Erythropoese sowie untereinander wird diskutiert.

VI SCHRIFTTUM

BETKE, K. — Der menschliche rote Blutfarbstoff bei Fetus und reifem Organismus, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954

BETKE, K. — Hämatologie der ersten Lebenszeit. Erg. Inn. Med., 9, 437, 1958

BORST, KÖNIGSDÖRFFER — Untersuchungen über Porphyrie, S. Hirzel, Leipzig 1929

BRUGSCH, J. — Porphyrine. Joh. Ambros. Barth, Leipzig 1959

CARTWRIGHT, G.E. — Studies On Free Erythrocyte Protoporphyrin, Plasma Iron And Plasma Copper In Normal And Anemic Subjects. Blood, 3, 501, (1948)

CHU, T.G., GREEN, A.A., CHU, E.J. — Paper chromatography of methyl esters of porphyrins. J. biol. Chem. 190, 643, (1951)

FIKENTSCHER, R. — Über Porphyrinbefunde im Serum von Feten und Neugeborenen. Klin. Wschr. 14, 569 (1935)

Untersuchungen über den Porphyrinstoffwechsel in der Schwangerschaft. Zschr. Geb.hilfe 111, 164 (1935)

FISCHER, H. — Die Chemie des Pyrrols, II. B.: Pyrrolfarbstoffe, 1. Hälfte: Porphyrine, Hämin, Bilirubin und ihre Abkömmlinge. Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig 1937

GOLDBLOOM, R.B., FISCHER, E., REINHOLD, J., HSIA, D.Y.Y.
Studies on the mechanical fragility of erythrocytes.
Blood 8, 164 (1953)

GOLDBLOOM, R.B., GOTTLIEB
Studies on icterus neonatorum.
J. Clin. Invest. 8, 375 (1930)

HEILMEYER, L., (CLOTTEN u. HEILMEYER, Mitarbeiter)
Die Störungen der Bluthämsynthese.
Georg Thieme, Stuttgart 1964

HIJMANS VAN DEN BERGH, A.A.
HIJMAN, A.J.
Studien über Porphyrin.
Deutsche med. Wschr. 54, 1492 (1928)

HUBER, R., KÖHNE, D.
Zur Herkunft des Fruchtwassers.
Gynaecologia (Basel) 155, 160 (1963)

KEHL, R., STICH, W.
Die papierchromatographische Analyse der Porphyrine (1. Mitt.) Hoppe-Seylers Z. phys. Chemie 289, 6 (1951)

Die papierchromatographische Analyse der Porphyrine (2. Mitt.) Hoppe-Seylers Z. phys. Chemie 290, 151 (1952)

KEPP, R., OEHLERT, G. (Herausgeber)
Hämatologische und immunbiologische Probleme der Fetal- und Neonatalperiode, 1. Teil: Blutbildung und Blutumsatz beim Feten und Neugeborenen.
Ferdinand Enke, Stuttgart 1962

KLEIHAUER, E.
Fetales Hämoglobin und fetale Erythrocyten.
Ferdinand Enke, Stuttgart 1966

KOMARKOVA	Pyrrolfarbstoffe. Handbuch der Papierchromatographie Bd. I, 712, Georg Thieme, Leipzig 1963
KÖRTÜM, G.	Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie. Springer, Heidelberg 1962
KRAMMER, CARTWRIGHT, G.E., WINTROBE, M.M.	Studies on free erythrocyte coproporphyrin and protoporphyrin. Blood 9, 183 (1954)
KÜNZER, W.	Über den Blutfarbstoffwechsel gesunder Säuglinge und Kinder. S. Karger, Basel-New York 1951
MAUZERHALL, D., GRANICK, S.	The occurrence and determination of delta-aminoläevulic acid and porphobilinogen in urine. J. biol. Chem. 219, 435 (1956)
SCHWARTZ, S. WIKOFF	The Relation of Erythrocyte Coproporphyrin and Protoporphyrin to Erythropoesis. J. biol. Chem. 194, 563 (1952)
SCHWARTZ, S., BERGH, M.H., BOSSENMAIER, J., DINSMORE, H.	Determination of Porphyrins in Biological Materials. Methods of Biochemical Analysis. Bd. 8, 253 (1958)
SCHWENZER	Blutbildveränderungen bei übertragenen Neugeborenen, Geb.hilfe und Frauenheilk. 14, 69 (1954)
SHEMIN, D., RITTENBERG, D.	The biological utilization of glycin for the Synthesis of the protoporphyrin of hemoglobin. J. biol. Chem. 166, 621 (1946)

STICH, W. — Neue Ergebnisse über Porphyrinstoffwechsel und Porphyrinkrankheiten. Klin. Wschr. 37, 681 (1959)

STICH, W. — Physiologie und Pathologie der Hämsynthese. Folia haemat. N.F. 9, 197 (1964)

WALKER, TURNBULL — Hemoglobin and red cells in the human foetus and their relation to the oxygen content of the blood in the vessels of the umbilical cord. Lancet 1953 II, 312

WATSON, C. J. — The Erythrocyte Coproporphyrin. Arch. int. med. 86, 747 (1950)

WATSON, C.J., GRINSTEIN, M., HAWKINSON, V. — Studies of Protoporphyrin. J. Clin. Invest. 23, 69 (1944)

LEBENSLAUF

Geboren am 19. 8. 1940 zu Amberg als Sohn des Regierungsforstrats Max Schmidt, trat ich nach dem Besuch der Volksschule (1946-1950) in die Höhere Schule über - Realgymnasium Icking und Altes Realgymnasium München -. Am 15. Juli 1959 erhielt ich das Reifezeugnis mit großem Latinum.

Nach 5 Semestern Studium der Medizin bestand ich die ärztliche Vorprüfung am 14. 4. 1962 mit Note I.
Nach weiteren 6 Semestern klinischen Studiums legte ich die ärztliche Prüfung mit dem Urteil "sehr gut" ab.

Vom 1. 11. 1965 bis 31. 8. 1966 war ich als Medizinalassistent an der II. Universitäts-Frauenklinik München tätig, vom 1. 9. 1966 bis 30. 4. 1967 an der I. Medizinischen Klinik der Universität München.

Gegenwärtig bin ich als Medizinalassistent an der Chirurgischen Universitätsklinik München.